



AUSLEGESCHRIFT

1 214 438

Int. Cl.: (H01) 63

G 01 n

Deutsche Kl.: 421 - 3 - 54

Nummer: 1 214 438

Aktenzeichen: W 15303 IX b/421

Anmeldetag: 13. November 1954

Auslegungstag: 14. April 1966

1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, Einrichtungen und Diagnosemittel zum Nachweis von Gelbkörperstoffwechselprodukten in von der Frau ausgeschiedenen Körperflüssigkeiten zum Zweck, die empfängnisfreien Tage der Frau zu bestimmen.

Die bekannten Verfahren zum Nachweis von Gelbkörperstoffwechselprodukten konnten bisher deshalb nicht zur Bestimmung der empfängnisfreien Tage der Frau herangezogen werden, da in den von der Frau ausgeschiedenen Körperflüssigkeiten stets gewisse Mengen dieser Stoffwechselprodukte vorhanden sind und hierauf gerichtete Nachweisreaktionen für den angegebenen Zweck als zu unzuverlässig erachtet wurden.

Die Erfindung geht von der Aufgabe aus, der geschilderten Schwierigkeit abzuhefen und ein Nachweisverfahren für Gelbkörperstoffwechselprodukte vorzuschlagen, welches eine zuverlässige Bestimmung der empfängnisfreien Tage der Frau ermöglicht.

Die Aufgabe wird gemäß der Erfindung dadurch gelöst, daß mindestens ein in der Körperflüssigkeit vorkommendes Gelbkörperstoffwechselprodukt durch mit einer Farbänderung verbundene Reaktionen bestimmt wird und daß dabei Maßnahmen getroffen werden, um nur bei Anwesenheit solcher Mengen des Stoffwechselproduktes die Farbänderung festzustellen, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

Eine bevorzugt zur Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens verwendete Einrichtung zeichnet sich dadurch aus, daß unten an einen die zu prüfende Körperflüssigkeit enthaltenden Behälter ein Auslaufrohr lösbar angesetzt ist, das eine feine Austrittsöffnung für die zu prüfende Körperflüssigkeit aufweist, und daß lotrecht unter der Austrittsöffnung ein rohrförmiger Behälter vorgesehen ist, der eine Lösungsmittelsäule enthält und an seinem unteren Ende mit einem Überlaufrohr in Verbindung steht, und daß schließlich die freie Öffnung des Überlaufes so weit unter dem Niveau der freien Austrittsöffnung liegt, daß der aus der feinen Öffnung austretende Flüssigkeitsstrahl die Oberseite der Lösungsmittelsäule in Form einer Folge von Flüssigkeitstropfen erreicht.

Ein Diagnosemittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Totalvolumen von höchstens 60 ccm mindestens zwei Stoffgemische enthält, von denen das eine im Kontakt mit mindestens einem in einer Körperflüssigkeit der Frau vorkommenden Gelbkörperstoffwechselprodukt zu einer Farbän-

Verfahren, Einrichtung und Diagnosemittel zum Nachweis von Gelbkörperstoffwechselprodukten

Anmelder:

FAIAG Aktiengesellschaft
für Forschung und Industrie,
Schwerzenbach, Zürich (Schweiz)

Vertreter:

Dr.-Ing. W. Höger
und Dipl.-Ing. W. Stellrecht M. Sc.,
Patentanwälte, Stuttgart 1, Uhlandstr. 16

Als Erfinder benannt:

Werner Wild, Zürich (Schweiz)

2

derung führt, während das andere geeignet ist, die Farbänderung derart zu hemmen, daß nur solche Mengen des Stoffwechselproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

Als Kriterium bei der Bestimmung der empfängnisfreien Zeit bei der Frau galt bisher der Ovulationstermin. Dementsprechend sind alle bisher bekannten Methoden zur Bestimmung der empfängnisfreien Zeit auf eine möglichst genaue Ermittlung der Ovulation als solche gerichtet. Nach neuesten Erkenntnissen des Erfinders ist jedoch die Ovulation in bezug auf die empfängnisfreie Zeit bedeutungslos, weil die einer Ovulation im allgemeinen folgende biologische Sterilität der Frau nicht eine Folge der Ovulation ist, sondern eine solche des sich im geplatzten Graafschen Follikel bildenden Corpus luteum. Aus diesem Grunde wird erfindungsgemäß bei der Bestimmung der empfängnisfreien Zeit nicht die Ovulation, sondern die Funktionstüchtigkeit des Corpus luteum ermittelt.

Der Gelbkörper erzeugt bekanntlich Progesteron, welches im Ablauf des mensuellen Zyklus der Frau die folgenden wichtigen Funktionen ausübt:

1. hemmt es die weitere Eireifung auf den Ovarien;
2. lähmt es die Gebärmuttermuskulatur als Schutz für das
3. unter seinem Einfluß sich in den sekretorischen Zustand umwandelnde und »aufwuchernde« Endometrium, und
4. erhöht es als weitere Schutzfunktion für das Endometrium die Viskosität des Zervikalschleimpfropfs in der Cervix.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Frau selbst zu Hause angewendet werden kann. Während im Laboratorium jede den Verfahrens- anforderungen, im besonderen der Extraktion des Stoffwechselproduktes aus der Körperflüssigkeit angepaßte Apparatur geeignet ist, ist für den Laien eine speziell kleindimensionierte Einrichtung, die ein schematisches Arbeiten nach Gebrauchsanweisung ermöglicht, unerlässlich. Zur raschen und zuverlässigen Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens durch Laien wird das Diagnosemittel, d. h. die notwendigen Chemikalien, Lösungsmittel, Reagenzien, Farbstoffe usw. zweckmäßig als für je eine Bestimmung gebrauchsfertig dosierte und möglichst lange haltbare Packung zubereitet. Diese Packungen bestehen z. B. aus Ampullen, Röhrchen u. dgl. aus Glas oder Kunststoff sowie in Form von Portionspackungen abgeschweißten Plastikschräuchen usw. Solche für je eine Bestimmung kombinierten Pakungen ersparen nicht nur das lästige Abmessen der einzelnen Portionen, sondern gewährleisten auch eine größere Haltbarkeit als z. B. bei immer wieder geöffneten Flaschen.

Ein solches erfindungsgemäß kombiniertes Diagnosemittel wiegt verpackt beispielsweise 30 g und hat ein Volumen von etwa 34 ccm; es läßt sich zu Jahrespackungen zu zwölf bis zwanzig Bestimmungen mit einem Totalgewicht von rund 500 g zusammenstellen. Das einzelne Diagnosemittel für eine Bestimmung wiegt nicht ganz 16 g und besitzt ein Volumen von rund 19 ccm, also bedeutend weniger als bei sämtlichen bekannten Pregnandiolbestimmungsverfahren, von denen kein einziges mit total weniger als 60 bis 70 ccm Chemikalien auskommen kann.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nachfolgend in einer für den Pregnandiol-Pregnanolon-Komplex bevorzugten Ausführung rein beispielsweise beschrieben:

Fig. 1 zeigt einen zur Einrichtung gehörigen Extraktionsapparat im Betriebszustand;

Fig. 2 zeigt eine ganze Einrichtung ineinandergeschachtelt im Nichtbetriebszustand;

Fig. 3 zeigt einen Schüttelbecher für die Waschflüssigkeiten mit aufgesetztem Deckel;

Fig. 4 zeigt einen Gefäßhalter mit einem Reaktionsgefäß, einem Brenner und einem Kondensatorschlauch im Betriebszustand.

Das Verfahren besteht im wesentlichen darin, daß der Pregnandiolkomplex aus dem frischen, während 8 bis 10 Stunden ausgeschiedenen und dann mit Kochsalz abgesättigten Urin extrahiert, der Extrakt gewaschen, der Pregnandiol-Pregnanolon-Komplex anschließend direkt als Bariumsalz gefällt und dann als Präzipitat auf seinen Glukuronsäuregehalt mit Hilfe der Tollens-Reaktion untersucht wird. Sowohl in der Extraktionsstufe, der Extraktwaschung, der Fällung als auch der Farbreaktion nach Tollens sind in das Verfahren gewollte Hemmstufen eingebaut, welche seine Empfindlichkeit auf den weiter obengenannten Schwellenwert reduzieren. Auf diese Hemmstufen wird später noch näher hingewiesen.

Der zweckmäßigerweise vom Laien zu verwendende Extraktionsapparat (Fig. 1) besteht aus einem Basisgefäß 1 und einem in diesem eingesetzten Extraktor 2 (Rohrdurchmesser vorteilhaft 10,5 mm, nicht über 20 mm), welcher am Basisgefäß 1 mittels Dichtungen 9 hermetisch abschließt. Am Extraktor 2 ist über eine Dichtung 14

ein Düsenstück 3 (Düsendurchmesser vorteilhaft 0,58 mm) angeschraubt und auf diesem über eine Dichtung 18 ein Kopfgefäß 4. Im Kopfgefäß 4 ist eingelegt ein mit einer Spannfeder 6 gehaltenes Sieb 7, und das Ganze ist verschlossen mit einem aufgelegten Deckel 5. Im oberen Teil des Extraktors 2 befinden sich eine aus einem Kolben 15, einer Anschlagschraube 16, einer Druckfeder 17 und einem Ventilschlauch 25 bestehende Pumpe sowie ein aus einem Ventilknopf 12, einer Ventilscheibe 11, einer Dichtung 10 und einer Durchlaßöffnung 13 bestehendes Ventil. Am Extraktor 2 sind seitlich angebracht ein Überlauf 2a sowie zuunterst ein Verschlußdeckel 8. Im oberen Teil des Düsenstückes 3, d. h. unmittelbar über der Düse, kann ein Regulierventil angebracht werden, um den Druck des durch die Düse strömenden Urinstrahles zu regulieren; dieses Ventil ist indessen nicht unbedingt notwendig und deshalb in der Zeichnung weggelassen.

Im Nichtbetriebszustand der Einrichtung (Fig. 2) sind Kopfgefäß 4, Düsenstück 3 sowie alle übrigen Bestandteile im Innern des Basisgefäßes 1 untergebracht. Die Einrichtung besitzt dann nur noch rund ein Drittel ihrer Betriebshöhe. Der Deckel 5, dessen Dichtung 19 dazu bestimmt ist, einen Schüttelbecher 23 abzuschließen (Fig. 3), ist nun im oberen Teil des Extraktors 2 eingeschraubt, wo im Betriebszustand das Düsenstück 3 befestigt wird. Das Ventil 12 ist geschlossen und der Pumpenkolben 15 wird vom Deckel 5 niedergehalten. Zwei auf den Extraktor 2 aufgeklebte Drahtklammern 24 sind dazu bestimmt, die beiden Reaktionsgefäße 21, z. B. aus feuerfestem Glas (von denen im Schnitt Fig. 2 nur eines gezeichnet ist), und das Düsenstück 3 im Innern des Basisgefäßes bzw. des Kopfgefäßes 4 festzuhalten. Zuunterst ist der Schüttelbecher 23 vom erweiterten Beruhigungsteil des Extraktors 2, dahinter ein Brenner 24 und daneben ein Gefäßhalter 20 fixiert. Ein Kondensatorschlauch 26 (Fig. 4) und das Sieb 6, 7 sind, weil elastisch und deshalb überall im Innern der Einrichtung unterbringbar, nicht eingezeichnet.

Als Sammelgefäß für den Harn und zu seiner Absättigung mit Kochsalz dient das Basisgefäß 1. Die Harnmenge aus 8 bis 10 Stunden Ausscheidungsdauer wird mit Leitungswasser bis zur unteren Marke am Basisgefäß 1 (Fig. 1) ergänzt, was einer Menge von 700 ccm entspricht, welche Menge innerhalb 8 bis 10 Stunden selten überschritten wird. Hierauf wird so viel Kochsalz beigelegt, daß das Flüssigkeitsniveau von der unteren bis zur oberen Marke ansteigt (770 ccm). Nun wird der Extraktor 2 mit eingeschraubten Deckeln 5 und 8 in das Basisgefäß 1 eingesetzt, so daß dieses durch die Dichtungen 9 hermetisch verschlossen wird. Nach 40 Sekunden dauerndem, kräftigem Schütteln ist der Urin mit dem zugegebenen Kochsalz abgesättigt.

Während des Schüttelns füllt sich der Extraktor 2 durch den anliegenden Überlauf 2a ebenfalls mit Harn. Nach Abschrauben des Deckels 5 zur Freilegung der oberen Öffnung des Extraktorrohres 2 wird das aus der Scheibe 11, der Dichtung 10 und der Öffnung 13 bestehende Ventil 12 geöffnet. Dieses erlaubt der Luft bei der anschließenden Extraktion, bei welcher sich das Basisgefäß 1 langsam füllt, den Abzug. Nach Einfüllen der z. B. in einer Portionspackung aus Kunststoffschlauch enthaltenen Extraktflüssigkeit, bestehend aus 9 ccm Amylbutyl-

Diese vier Genitalfunktionen sind aber nur gewährleistet, wenn die Progesteronproduktion des Gelbkörpers ein genügend hohes Maß erreicht.

Bei ungenügender Progesteronproduktion bzw. einem nicht voll funktionstüchtigen Corpus luteum (was mit oder ohne äußere Einflüsse der Fall sein kann, wie z. B. Kuren, Klimawechsel, Krankheiten usw.) ist als erstes die Hemmung der Eireifung auf den Ovarien nicht immer gewährleistet. Es bildet sich dann innerhalb der nächsten 8 bis 10 Tage ein zweiter sprungreifer Follikel im gleichen Menstruationszyklus heran, der unmittelbar vor der üblicherweise folgenden Regelblutung beim normalen Rückgang der an sich schon zu geringen Progesteronmenge platzt. Es ergibt sich eine prämenstruelle Sekundäroovulation, die in der sogenannten »empfangnisfreien« Zeit zur Empfängnis führen kann. Der bei der Sekundäroovulation entstehende zweite Gelbkörper verhindert das Eintreten der zu diesem Zeitpunkt üblichen Menstruation und verschiebt diese bis zu seiner Degeneration um 12 bis 14 Tage, sofern die Sekundäroovulation nicht zur Befruchtung geführt hat. Selbstverständlich kann sich die prämenstruelle Sekundäroovulation auch bei einem voll funktionstüchtigen Corpus luteum ereignen; eine Befruchtung ist dann aber nicht möglich, weil bei genügend hoher Progesteronproduktion die Gebärmuttermucosa sich in aufgewuchertem Zustand und der Zervikalschleim sich in erhöhter Viskosität befinden, so daß diese beiden natürlichen Barrieren den eindringenden Spermatozoen den Eintritt und Durchgang durch die Gebärmutter und infolgedessen das Aufsteigen bis zu den Ovarien verwehren.

Diese Zusammenhänge konnten experimentell unter praktischer Erprobung durch eine größere Anzahl Ehepaare festgestellt werden. Es ergaben sich dabei prämenstruelle Sekundäroovulationen sowohl bei ungenügender als auch genügender Gelbkörperaktivität. Dabei stellten sich aber nur im ersten Fall Schwangerschaften ein, während der zweite Typ von Sekundäroovulationen ohne Folgen blieb.

Gemessen am wichtigsten Ausscheidungsprodukt des Progesterons, dem Pregnandiolglukuronid, das in seinem Komplex als »Verunreinigung« 25% Pregnanolon mitenthält, ergab sich auf Grund dieser empirischen Versuche, daß im durchschnittlichen Fall bei einer Tagesausscheidung von 3,5 mg Pregnandiolglukuronid (inklusive Pregnanolon) und in einigen Einzelfällen von mindestens 2,5 mg vom Vorliegen eines funktionstüchtigen Gelbkörpers gesprochen werden kann. Dieser Zusammenhang stimmt gut überein mit der bereits bekannten Tatsache, daß während der Proliferationsphase des Endometriums 1 bis 2 mg Pregnandiolglukuronid pro Tag im Harn der Frau ausgeschieden werden, welche Minimalmengen dem Nebennierenrindenstoffwechsel oder einer zu frühen Luteinisierung des Follikels entstammen. Demgegenüber betragen, wie bekannt, die in der eigentlichen Gelbkörperphase ausgeschiedenen Normalmengen an Pregnandiolglukuronid im Mittel 8 bis 9 mg pro Tag.

Unterhalb des obengenannten Schwellenwertes von 3,5 bzw. 2,5 mg Pregnandiolglukuronid pro Tag ergeben sich befruchtungsfähige Sekundäroovulationen, weil dann die gleichzeitige Aufwucherung der Gebärmutter Schleimhaut als auch die Erhöhung der

Zervikalschleimviskosität unvollkommen sind und nicht als Barrieren wirken können, während Sekundäroovulationen oberhalb dieses Schwellenwertes nicht mehr befruchtungsfähig sind.

Bei Beachtung der genannten Schwellenwerte hingegen läßt sich aber nicht nur die Funktionstüchtigkeit des Gelbkörpers nachweisen, sondern gleichzeitig werden auch die geringen aus dem Nebennierenrindenstoffwechsel stammenden (Umwandlung des Desoxycorticosterons in Progesteron) sowie die schon präovulativ im ungeplatzten Follikel allfällig erzeugten Mengen an Progesteron bzw. Pregnandiol »überbrückt«. Die bisher bekannten Verfahren, sei es nun zur Progesteron- oder Pregnandiolbestimmung sowie weitere Verfahren zur Bestimmung anderer Abbauprodukte des Progesterons können mit Empfindlichkeitsschwellen versehen werden, die den weiter obengenannten Schwellenwerten äquivalent sind. Damit werden solche rein quantitativen Stoffbestimmungsverfahren automatisch zu qualitativen Verfahren zur Bestimmung der empfangnisfreien Zeit, sofern die zu ihrer Durchführung benötigte Verfahrensdauer nicht zu lang ist, um die Reaktion so frühzeitig zu erhalten, daß noch eine befriedigende Ausnützung möglich ist.

Die Einführung eines solchen Schwellenwertes in irgendwelche bekannten Verfahren läßt sich einfach dadurch erreichen, daß z. B. die Sichtbarkeit einer Farbreaktion bis zur vorgeschriebenen Grenze aufgehoben wird. Dies läßt sich erzielen, indem entweder durch beschränkte stöchiometrische Umsetzung nur so viel des reagierenden Stoffes in die Farbreaktion aufgenommen wird, daß diese erst beim Schwellenwert infolge ihrer eigenen Empfindlichkeitsgrenze anspricht (z. B. Verwendung schlechter Lösungsmittel, damit nur ein Teil des reagierenden Stoffes in Lösung geht), oder aber indem die Farbreaktion selbst durch chemisch oder physikalisch wirkende Zusätze gehemmt wird. Solche Zusätze können oxydierende oder reduzierende (bleichende) und auch komplexbildende Stoffe sein, die den entsprechenden Farbanteil maskieren, oder auch Adsorptions- oder Fällungsmittel, die den Schwellenwertanteil in sich aufnehmen oder ausfällen, oder Komplementärfarben, die den Schwellenwertanteil kompensieren.

Die heute bekannten Verfahren zur Bestimmung von Progesteron im Blut bzw. seinen Abbauprodukten und speziell Pregnandiol im Harn sind für die Geburtenkontrolle praktisch unbrauchbar und eignen sich nur für klinisch-diagnostische Zwecke. Sie sind durchweg umständlich, verlangen teure Apparaturen und hochqualifiziertes Personal. Darüber hinaus liefern sie allesamt die Resultate mit so großer Verspätung, daß an eine praktische Anwendung ohne bedeutende Modifikationen gar nicht zu denken ist. Das Verfahren nach der Erfindung vermeidet diese Nachteile. Da der Nachweis der empfangnisfreien Zeit keine quantitative Hormonbestimmung erfordert, sondern nur die Feststellung eines Minimal-Hormanspiegels in halbqualitativer Weise, ist ein einfaches, rasch durchführbares Verfahren entwickelt worden.

Das Verfahren ist so einfach durchführbar und der zu seiner Durchführung nötige Zeitaufwand so gering, daß es nicht nur für das speziell zum Zweck der Feststellung der empfangnisfreien Zeit für seine Kundinnen eingerichtete Laboratorium geeignet ist, sondern darüber hinaus von jedem Laien bzw. jeder

alkohol im Volumenverhältnis 1:2, in das Extraktorrohr 2 bildet sich in diesem eine Lösungsmittelsäule, die sich auf dem salzgesättigten Urin darin aufschichtet; infolge des Überlaufes stellt sich das Lösungsmittel immer auf gleiches Niveau ein, nämlich etwa 4 cm unter der Düse. Nach dem Einfüllen werden auf den Extraktor 2 das Düsenstück 3 und auf dieses das Kopfgefäß 4 aufgeschraubt und in dieses letztere das Sieb 6, 7 eingelegt. Hierauf wird das mit salzgesättigtem Urin gefüllte Basisgefäß 1 abgenommen und in das Kopfgefäß 4 entleert. Das Basisgefäß 1 wird sofort wieder unten angebracht, da bald Urin durch den Überlauf entweicht; der Deckel 5 wird auf das Gefäß 4 aufgelegt und der Apparat beiseite gestellt.

Die Harnmenge von rund 770 ccm strömt nun während ungefähr 35 Minuten in feinem Strahl durch die Düse und prallt auf die Oberfläche des im Extraktor befindlichen Amylbutylalkohols an jener Stelle auf, wo sich der Strahl in feine Tröpfchen auflösen beginnt (Durchflußmenge etwa 22 ccm je Minute). Hierbei wird der Harn in viele winzig kleine Tröpfchen zerschlagen, die langsam durch die Lösungsmittelschicht absinken, sich unter dieser wieder mit dem bereits extrahierten Harn vereinigen, durch den Überlauf 2a emporsteigen und ins Basisgefäß 1 zurückfließen. Hierbei erfolgt die Extraktion des Pregnandiolglukuronides aus dem Harn.

Nach dem Passieren des Urins werden das Gefäß 4 und das Düsenstück 3 abgeschraubt, mit Wasser gespült und wieder angebracht. Die zur Extraktwaschung erforderliche Waschflüssigkeit, bestehend aus 5 ccm ammoniakalischem Äther-Butanol-Gemisch (aus einer Portionenpackung aus Kunststoff) im Volumenverhältnis 5:1 und 0,5 ccm Wasser mit 200 mg darin gelöstem Kochsalz, wird unter Zusatz von 35 ccm Trink- bzw. Leitungswasser in dem mit dem Deckel 5 verschlossenen Schüttelbecher 23 kräftig vermischt (Fig. 3) und ins Kopfgefäß 4 entleert. Die Waschflüssigkeit passiert nun gleich wie der Harn bei der Extraktion die Extraktphase, wäscht diese, so daß der größte Teil der Verunreinigungen aus dem Extrakt ausgewaschen wird. Infolge des Äthercharakters der Waschflüssigkeit und der kleinen Kochsalzzugabe geht das Pregnandiolglukuronid in der Großzahl aller Fälle nicht in die Waschflüssigkeit über. Es gibt indessen aber Ausnahmefälle bei außerordentlich schwach verunreinigten Harnen: die Verunreinigungen sind dann bereits im ersten Moment der Waschung aus dem Extrakt entfernt, so daß der größte Teil der Waschflüssigkeit ohne weitere Stoffaufnahme den Extrakt passiert und aus diesem Grunde das Pregnandiolglukuronid trotz Äther- und Kochsalzgehalt auswaschen kann. In solchen Fällen chronisch schwach verunreinigter Extrakte empfiehlt es sich, jeweils von den rund 40 ccm gemischter Waschflüssigkeit nur zwei Drittel oder in Extremfällen nur die Hälfte zu verwenden. Anschließend erfolgt eine Nachwaschung mit 35 bis 40 ccm gesättigtem Kochsalzwasser zwecks Entwässerung des trüben Extraktes und Entfernung von überschüssigem Ammoniak. Der Extrakt ist hierauf meistens farblos klar.

Nach dem Absetzen der letzten, feinsten in Suspension befindlichen Salzwassertröpfchen (2 bis 3 Minuten nach der Salzwasserwaschung) werden Düsenstück 3 und Kopfgefäß 4 abgeschraubt und das Ventil 12 geschlossen. Das Urinniveau im Basis-

gefäß 1 steht infolge der Volumenzunahme durch die Waschflüssigkeiten nun etwas über der Überlauföffnung 2a. Ein entsprechend geformter Stechheber (in den Zeichnungen nicht dargestellt) wird auf die Dichtung 14 gepreßt und mit dem Zeigefinger der andern freien Hand der Pumpenkolben 15 betätigt. Der auf den Kolben drückende Finger ist zugleich Einlaßventil, und die ins Basisgefäß 1 gedrückte Luft wird durch den Ventilschlauch 25 am Entweichen gehindert. Durch den im Inneren des Gefäßes 1 erzeugten Überdruck steigt die Extraktphase im Extraktor empor, bis sie sich vollständig in dem auf der Dichtung 14 ruhenden Stechheber befindet. Dessen freie Öffnung am oberen Ende wird nun mit dem Finger zugehalten und der Extrakt in eines der Reaktionskölbchen 21 aus feuerfestem Glas umgeleert, das innen trocken sein muß. Anstatt mit Überdruck durch die Pumpe 15 kann der Extrakt natürlich auch mittels Pipette und Saugbällchen aus dem Extraktor 2 herausgesaugt werden. Die delikate Pumpeinrichtung ließe sich so erübrigen.

Der gewaschene Extrakt ist trotz seiner Farblosigkeit noch relativ stark verunreinigt. Aus diesem Grunde wird das Pregnandiolglukuronid vorteilhaft als Bariumsalz direkt aus dem Extrakt ausgefällt, was infolge der Löslichkeits- und Konzentrationsverhältnisse nicht in herkömmlicher Weise möglich ist. Dem Extrakt werden hierzu aus dem entsprechenden Beutel des Diagnosemittels 0,3 g Silicagel von 0,2 bis 1,0 mm Körnung zugesetzt, das mit rund 28 mg Bariumacetat durch Wässern in destilliertem Wasser mit 100 g Bariumacetat je Liter und nachheriges Trocknen imprägniert ist. Extrakt und Silicagel werden ungefähr 1 Minute lang mäßig geschüttelt. Zuerst lagert sich hierbei am Silicagel ein Teil der im Extrakt verbliebenen Restfeuchtigkeit ab und bildet einen Wassermantel um dieses, der das obige Bariumsalz in höchster Konzentration gelöst enthält. Fast gleichzeitig werden vom feuchten Silicagel fast alle im Extrakt vorhandenen Stoffe adsorbiert, indem sie durch den Bariumsalz-Wassermantel passieren. Bei dieser Passage wird das Natrium-Pregnandiolglukuronid augenblicklich als Barium-Pregnandiolglukuronid ausgefällt und infolge der mechanischen Wirkung des Schüttelns in kristalliner Form sofort aus dem Wassermantel heraus in den Extrakt zurückgewaschen. Diese Operation, die sich aus einer Adsorption, fast gleichzeitigen Fällung und quasi Desorption zusammensetzt und theoretisch die konventionellen Stufen der Adsorption, Elution, Trocknung, Neulösung, Fällung usw. in einer einzigen Stufe vollbringt, wird im folgenden als Adsorptionsfällung bezeichnet.

Das Suspensionskristallinat wird mit der flüssigen Phase unter Zurücklassung des Silicagels in ein zweites trockenes Kölbchen 21 umgeleert und zur Beschleunigung der Absetzung der Suspension 0,5 ccm Gasolin, Petroläther, Benzol usw. und 0,1 ccm n.1000-Salzsäure aus einer weiteren Portionenpackung des Diagnosemittels zugesetzt und durch sehr kräftiges Schütteln vermischt. Dadurch werden die festen Kristallinatbestandteile an ihrer Oberfläche naß und »klebrig«; sie lagern sich gegenseitig aneinander ab und sinken dadurch und infolge der durch die Feuchtigkeit verursachten Gewichtszunahme relativ rasch (innerhalb 10 bis 20 Minuten) in den Grund des Kölbchens ab, wo sie ebenfalls infolge ihres Feuchtigkeitsgehaltes klebenbleiben. Hierdurch

wird ein einfaches Ableeren der Mutterflüssigkeit ohne Aufwirbeln des Niederschlages möglich. Der Salzsäuregehalt der Feuchtigkeit verhindert eine Adsorption uronsaurer Verunreinigungen am Präzipitat.

Anschließend wird die überstehende Flüssigkeit abgeleert, das Kölbchen 21 kurze Zeit umgekehrt stehengelassen, um ein restloses Abfließen der Extraktflüssigkeit zu ermöglichen, und der an der Kölbchenwandung klebende Rückstand in Leitungswasser aufgenommen, welches bis zum Teilstrich des Kölbchens 21 (Fig. 4) eingefüllt wird. Diesem Wasser werden 1,5 ccm reine, konzentrierte Salzsäure (spezifisches Gewicht 1,19) und 0,5 ccm Äthyl- oder Propylalkohol (rein) mit 3 mg Naphthoresorcin aus weiteren Portionenpackungen des Diagnosemittels zugesetzt. Soll die Naphthoresorcinlösung mindestens 1 Jahr haltbar gemacht werden, so wird der Alkohol entlüftet (durch Kochen unter Rückflußkondensation) und hierauf vor der Lösung des Naphthoresorcins mit CO_2 gesättigt.

Zum Abstellen der Kölbchen 21 bedient man sich des Kölbchenhalters 20 (Fig. 4), der mit dem eingespannten Kölbchen 21 zusammen ein sicher stehendes Dreibein bildet, da er an seinem Ende einen breiten, zweizehigen Fuß besitzt. Sofern keine andere Flamme zur Verfügung steht, wird der lediglich aus einem Nöpfchen bestehende Brenner 22 (Fig. 4) mit Alkohol, Brennsprit, einer Metatablette, Kölnisch Wasser usw. oder, wenn jedes andere Brennmaterial fehlt, beim Abgießen mit der Extraktphase gefüllt (die allerdings beim Brennen etwas rußt) und angezündet. Auf das Kölbchen 21 wird der Kondensatorschlauch 26 aufgesetzt und das Reaktionsgemisch nach Beginn des Siedens während einer Minute über der Flamme gekocht. Der beim Kochen aus dem Kölbchen entweichende überliefende Dampf kondensiert dabei im Kondensatorschlauch 26, so daß die ganze Reaktion praktisch geruchlos vor sich geht. Diese Geruchsvernichtung durch Kondensation ist von Bedeutung, denn ohne sie würde in vielen Fällen die Anwendung durch Laien, also in Wohnräumen, unmöglich gemacht.

Nach dem Erkalten des Reaktionsgemisches wird der Kondensatorschlauch 26 in horizontaler Lage vom Kölbchen 21 abgenommen, um ein Auslaufen des Kondensates zu vermeiden. Aus der letzten Portionenpackung des Diagnosemittels werden 1,5 ccm mit 4 mg Anilin-Fettgrün je Liter leicht grüngelbten Benzols, Toluols oder Xylols zugesetzt und das Ganze kräftig während 15 bis 20 Sekunden geschüttelt.

Die von der sich oben abscheidenden Benzolschicht ausgezogene rotviolette Färbung ist die Indikation für die empfängnisfreie Zeit. Bleibt die Lösung grün, wasserklar oder gelb bis bräunlich, so ist entweder gar keine oder eine ungenügende Gelbkörperaktivität und infolgedessen Empfängnisgefahr vorhanden. In diesem Fall wird die Analyse 2 bis 3 Tage später wiederholt, bis die rotviolette Färbung erscheint. Normalerweise reicht eine monatlich ein- bis zweimalige Vornahme der Bestimmung für die Praxis vollständig aus, wobei die erste Bestimmung bei z. B. 28- bis 30tägigem Zyklus auf den 17. bis 18. Zyklustag fällt. Die eigentliche Arbeitszeit zur Vornahme der Bestimmung beträgt nur rund 15 Minuten und deren gesamthafte Durchführungsdauer etwa 1 Stunde (gegenüber einigen Stunden Arbeitszeit und einigen Tagen Durchführungsdauer bei be-

kannten Verfahren zur Pregnanndiolbestimmung). Die präovulatorische empfängnisfreie Zeit wird wie bisher auf Grund der Methode nach Knaus—Ogino berechnet, wobei sich in der Praxis zeigte, daß die Zuverlässigkeit durch diese Kombination nur unwesentlich verändert wird, weil eine Vorverlegung der Ovulation sehr selten vorkommt.

Gegenüber den bisher bekannten Verfahren unterscheidet sich das vorliegende vor allem in bezug auf seine außerordentliche Spezifität und seine relative Empfindlichkeit, was die Verwendung von weniger als ein Drittel Tagesharmmenge zuläßt. Der äußerst geringe Zeitaufwand erlaubt es, den Eintritt der empfängnisfreien Zeit schon 8 bis 9 Stunden nach Beginn der ersten Pregnanndiolbildung im weiblichen Organismus festzustellen. Damit kann praktisch von einer Verspätung gegenüber dem biologischen Eintritt der sterilen Phase nicht mehr gesprochen werden.

Die Art der Extraktion in dünnem Strahl ist bedingt durch die äußerst geringe Menge der verwendeten Lösungsmittel von nur 9 ccm bzw. ein Fünftel und achtzigstel der Harmmenge oder rund ein Zehntel bis ein Zwanzigstel der bekannten Verfahren. Bei herkömmlicher Extraktionsart (Schütteln, Preßluft-einblasen, Rührwerk usw.) würde sich die kleine Lösungsmittelmenge unter der mechanischen Einwirkung schon in ungefähr 500 ccm salzgesättigtem Urin völlig auflösen. Die Zugabe von Amylalkohol zum Butylalkohol reduziert die Löslichkeit für Pregnanndiol und stellt infolgedessen eine erste Stufe im totalen Schwellenwert dar.

Die Waschungsart besitzt gegenüber konventionellen Arten durch beispielsweise zweimaliges Ausschütteln mit je einem Drittel des Extraktvolumens an n/3- bis n/10-Natronlauge eine rund dreißigmal höhere Wirksamkeit, die einerseits durch die das Extraktvolumen um ein Mehrfaches übersteigende Waschflüssigkeitsmenge und andererseits durch den Äthercharakter des Waschwassers bedingt ist, welches letztere wiederum einem Übergang des Pregnanndiolglukuronides in die Waschflüssigkeit stark entgegenwirkt. Da es jedoch unmöglich ist, den Übergang eines kleinen Anteils an Pregnanndiol in die Waschflüssigkeit zu verhindern, so stellt dieser restliche Übergang einen weiteren Teil des Gesamtschwellenwertes dar.

Die wichtigste und das Verfahren am meisten verbessernde sowie auch verkürzende Operation ist die Adsorptionfällung. Sie kann als katalytische Fällung bezeichnet werden, wobei das Adsorbens die Rolle des Katalysators spielt. Außer der wesentlichen Vereinfachung der Methode bietet sie den Vorteil, daß die Fällung zu einer ausgesprochen zeitbedingten Operation wird: nur dem am raschesten und leichtesten ausfallenden Stoff gelingt sie, da alle eventuell langsamer ausfallenden Stoffe bereits vor ihrer Fällung am Silicagel fest gebunden sind. Die Adsorptionfällung ist deshalb spezifischer als die konventionellen Fällungsmethoden. Da das Zurückbleiben geringer Mengen Ba-Pregnanndiol in kristalliner Form im Innern der Poren des Silicagels nicht zu verhindern ist, ferner ein weiterer Teil einfach am Silicagel ohne andere Umsetzungen adsorbiert bleibt und ein anderer Teil noch im Extrakt gelöst enthalten ist, ergibt sich ein gewisser Verlust an Pregnanndiol im Endresultat, der wiederum als Anteil am Gesamtschwellenwert zu betrachten ist.

Die Zugabe von n 1000-HCl und Gasolin nach erfolgter Fällung zum Extrakt dient zur Beschleunigung der Absetzung und zur Vermeidung der Adsorption von Verunreinigungen am Präzipitat. Durch die Ausziehung des bei der Glukuronsäurereaktion nach Tollens gebildeten Farbstoffes mittels Benzol oder seiner Homologen an Stelle von Äther wird der Test spezifischer. Durch die Grünfärbung des Benzols werden schwach positive Befunde vermieden, indem jede nur schwache Rotfärbung durch die Komplementärfarbe Grün überdeckt wird. Infolgedessen sind jene physiologischen Minimalwerte an Pregnandiol, welche ihre Ursache in der Umwandlung des Desoxycorticosterons in Progesteron, in einer präovulativen ovariellen Progesteronsekretion und in einer eventuell ungenügenden »normalen« Gelbkörperaktivität haben, nicht feststellbar. Diese Grünfärbung soll als wichtigster Teil des Gesamtschwellenwertes dessen genaue Einstellung ermöglichen. Die gleiche Wirkung wie durch die verschiedenen aufgeführten Einzelstufen des Schwellenwertes könnte durch Reduktion des anfänglich verwendeten Volumens Körperflüssigkeit der Frau bzw. Urin insofern erzielt werden, als daß dann die gesamthaft durch das Verfahren laufenden Mengen einfach der natürlichen Empfindlichkeitsgrenze der Bestimmungsmethode unterworfen würden. Solche natürlichen Empfindlichkeitsgrenzen besitzen indessen meistens sehr stark »schleichenden« Charakter mit einer breiten Schwankungszone, so daß ein eigentlicher Schwellenwertpunkt auf diese Weise kaum erreichbar wäre.

Praktische Versuche mit dem neuen, erfindungs-gemäßen Verfahren haben eine wesentlich höhere Zuverlässigkeit als bei den besten herkömmlichen Verhütungsmitteln ergeben. Es hat sich gezeigt, daß das Versagerisiko dieser neuen Art Geburtenregelung um acht- bis zehnmal geringer ist als bei den bisherigen Methoden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Nachweis von Gelbkörperstoffwechselprodukten in von der Frau ausgeschiedenen Körperflüssigkeiten zu dem Zweck, die empfängnisfreien Tage der Frau zu bestimmen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein in der Körperflüssigkeit vorkommendes Gelbkörperstoffwechselprodukt durch mit einer Farbänderung verbundene Reaktionen bestimmt wird und daß dabei Maßnahmen getroffen werden, um nur bei Anwesenheit solcher Mengen des Stoffwechselproduktes die Farbänderung festzustellen, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein in der Körperflüssigkeit der Frau vorkommendes Gelbkörperstoffwechselprodukt unter Bildung eines Farbstoffes zur Reaktion gebracht und die Erkennbarkeit dieses Farbstoffes so weit reduziert wird, daß nur solche Mengen des Stoffwechselproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein im Urin der Frau vorkommendes Progesteronstoffwechselprodukt unter Bildung eines Farbstoffes zur Reaktion ge-

bracht und dieser Farbstoff durch die Gegenwart eines Komplementärfarbstoffes so weit maskiert wird, daß nur solche Mengen des Progesteronstoffwechselproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß im Urin der Frau vorkommendes Pregnandiolglukuronid in Gegenwart eines Gemisches von mindestens zwei Reaktionsstoffen in einen Farbstoff übergeführt und dieser hierauf mit einem Lösungsmittel aus der Reaktionslösung ausgezogen wird, welches Lösungsmittel eine so große Menge eines Komplementärfarbstoffes enthält, daß nur solche Mengen Pregnandiolglukuronid erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß in Gegenwart von Salzsäure und Naphthoresorcin eine Glukuronsäurereaktion des im Urin der Frau vorkommenden Pregnandiolglukuronides erfolgt und daß dabei der gebildete rotviolette Farbstoff durch Benzol ausgezogen wird, das eine so große Menge eines grünen Komplementärfarbstoffes enthält, daß nur solche Mengen Pregnandiolglukuronid erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

6. Einrichtung in Form eines Extraktionsapparates zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß unten an einen die zu prüfende Körperflüssigkeit enthaltenden Behälter (4) ein Auslaufrohr (3) lösbar angesetzt ist, das eine feine Austrittsöffnung für die zu prüfende Körperflüssigkeit aufweist, und daß lotrecht unter der Austrittsöffnung ein rohrförmiger Behälter (2) vorgesehen ist, der eine Lösungsmittelsäule enthält und an seinem unteren Ende mit einem Überlaufrohr (2a) in Verbindung steht, und daß schließlich die freie Öffnung des Überlaufes (2a) so weit unter dem Niveau der feinen Austrittsöffnung liegt, daß der aus der feinen Öffnung austretende Flüssigkeitsstrahl die Oberseite der Lösungsmittelsäule in Form einer Folge von Flüssigkeitstropfen erreicht.

7. Einrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Abmessungen der feinen Öffnung des Extraktionsapparates derart sind, daß sie einen Flüssigkeitsstrahl von höchstens 100 ccm pro Minute durchläßt, und daß der rohrförmige Behälter (2) einen Durchmesser von höchstens 20 mm besitzt.

8. Diagnosemittel zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Totalvolumen von höchstens 60 ccm mindestens zwei Stoffgemische enthält, von denen das eine im Kontakt mit mindestens einem in einer Körperflüssigkeit der Frau vorkommenden Gelbkörperstoffwechselprodukt zu einer Farbveränderung führt, während das andere geeignet ist, die Farbveränderung derart zu hemmen, daß nur solche Mengen des Stoffwechselproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

9. Diagnosemittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens zwei Stoffgemische enthält, von denen das eine im Kon-

takt mit mindestens einem im Urin der Frau vorkommenden Progesteronstoffwechselprodukt zur Bildung eines Farbstoffes führt, während das andere eine Komplementärfarbe dazu aufweist, die durch Zusatz zum Farbstoff diesen so weit maskiert, daß nur solche Mengen des Stoffwech-

selproduktes erkennbar sind, die einem leistungsfähigen Gelbkörper entstammen.

In Betracht gezogene Druckschriften:
The American Journal of Physiology, 121, H. 1, 1938, S. 98 bis 106.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

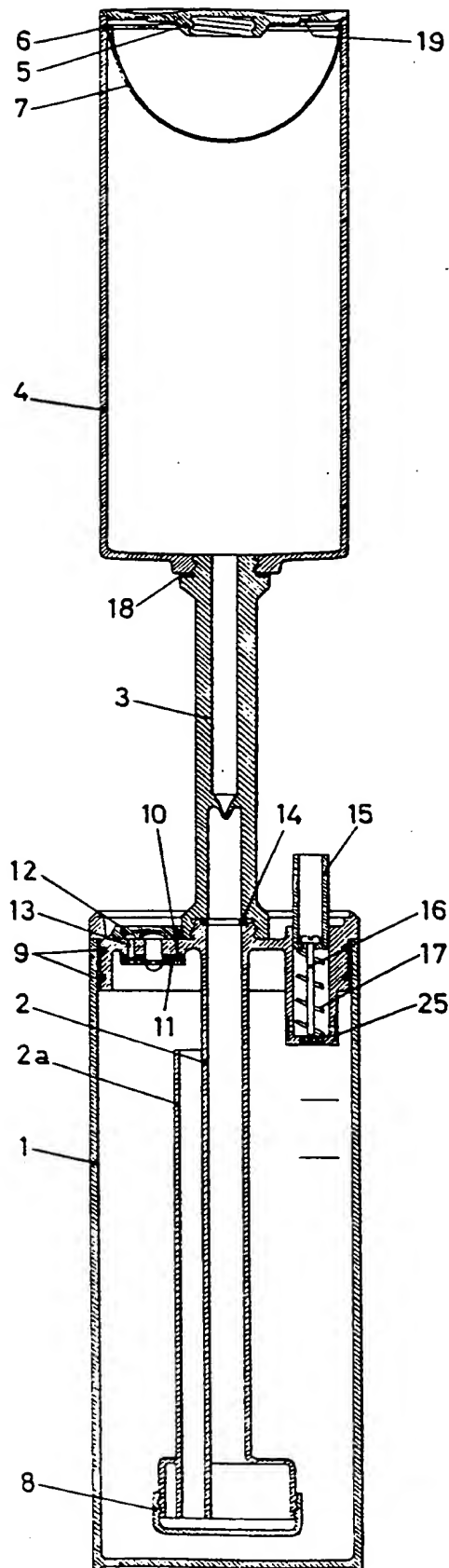


Fig. 1

Fig. 4

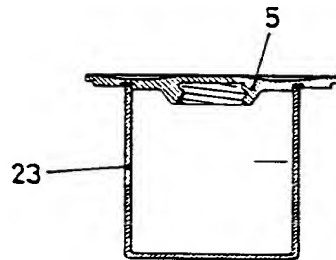
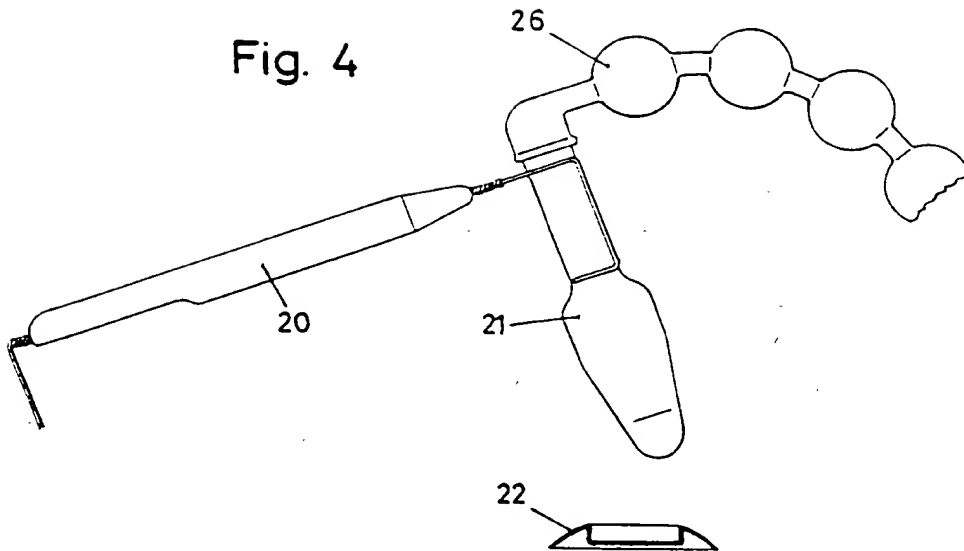


Fig. 3

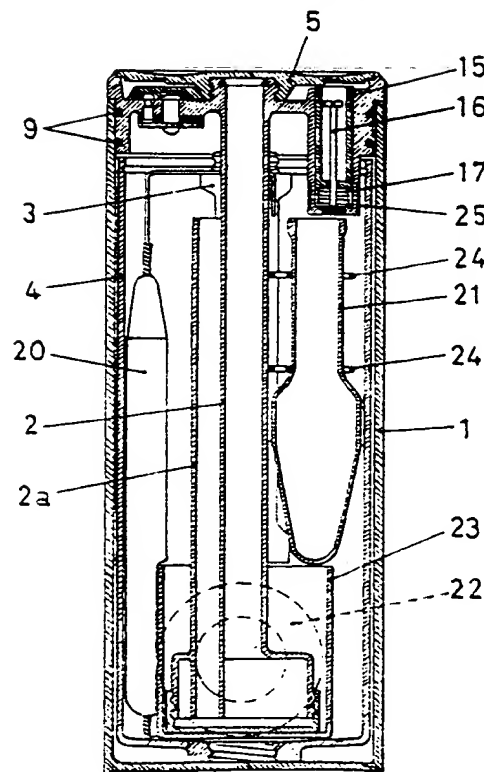


Fig. 2

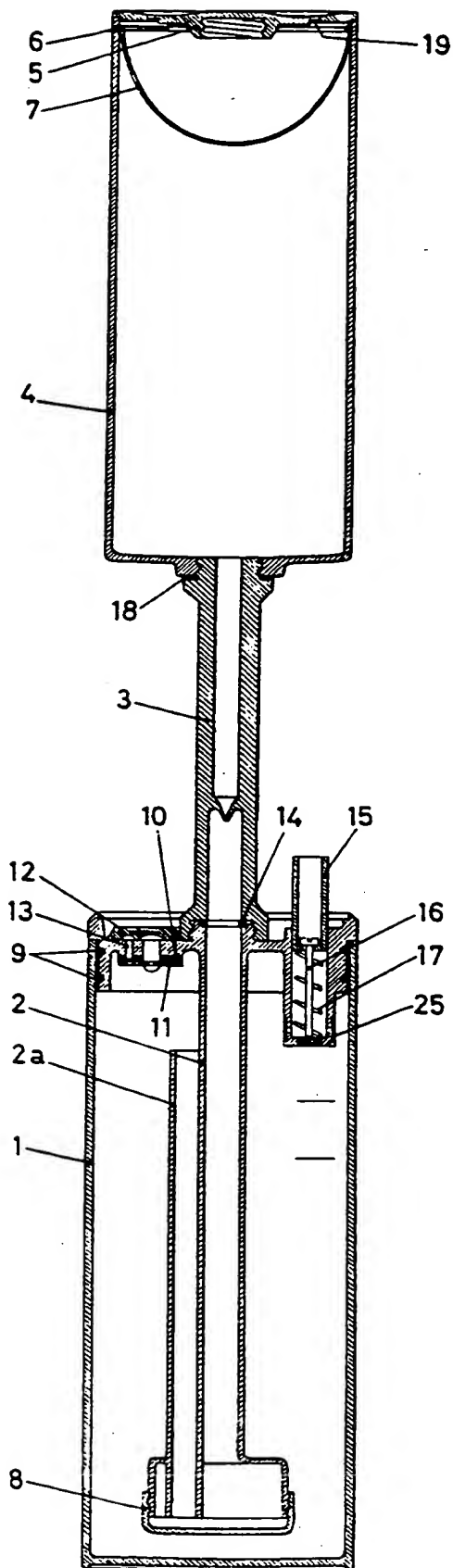


Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 4

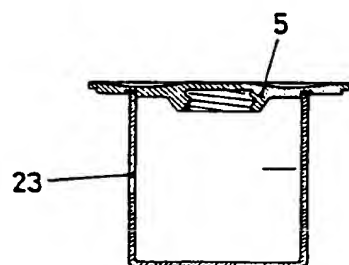
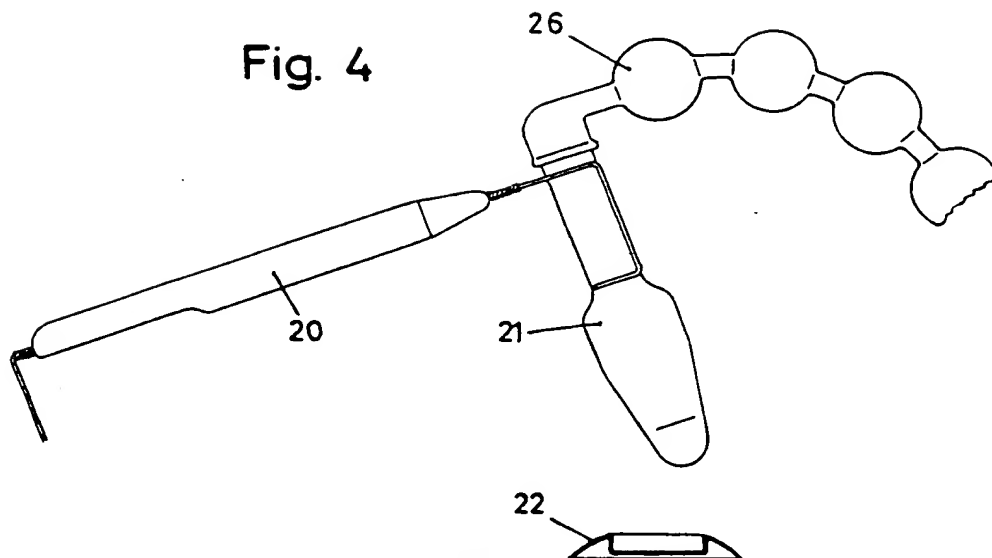


Fig. 3

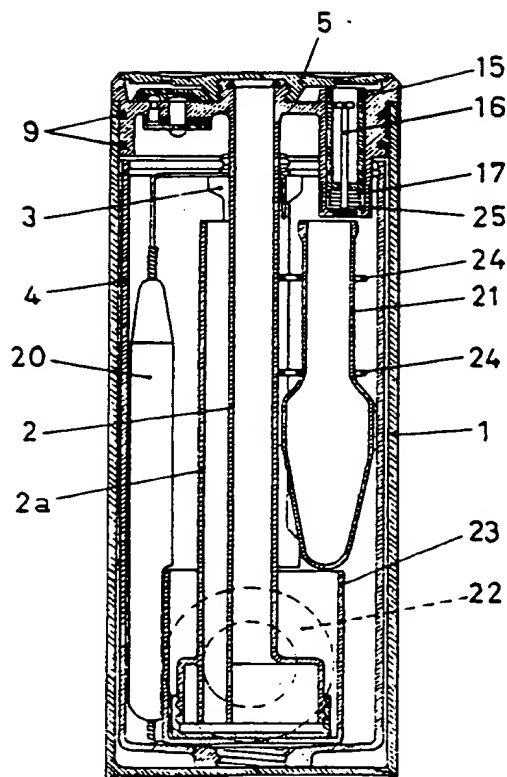


Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)